

Selection of peptide(s) with high binding affinity for target protein

Patent Number: DE4432943

Publication date: 1996-03-21

Inventor(s):

Applicant(s): RADULESCU RAZVAN T DR MED M D (DE)

Requested Patent: ☐ DE4432943

Application Number: DE19944432943 19940915

Priority Number(s): DE19944432943 19940915

IPC Classification: C07K14/00; C07K1/00; A61K38/00; G01N33/50

EC Classification: C07K1/00, C07K14/00B

Equivalents:

Abstract

A method for preparing peptides with a high binding affinity for a corresp. target mol. (esp. protein), with the name "Numerical Mirror Image Strategy" (NUMIS), is claimed (without being described further, except in the disclosure).

Data supplied from the esp@cenet database - I2

EV 094 907 233 US

THIS PAGE BLANK (USPTO)



①⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Off nlegungsschrift
⑩ DE 44 32 943 A 1

⑤ Int. Cl.⁶:
C 07 K 14/00
C 07 K 1/00
A 61 K 38/00
G 01 N 33/50

②① Aktenzeichen: P 44 32 943.1
②② Anmeldetag: 15. 9. 94
②③ Offenlegungstag: 21. 3. 96

DE 44 32 943 A 1

⑦① Anmelder:
Radulescu, Razvan T., Dr.med. M.D., 80805 München,
DE

⑦② Erfinder:
Antrag auf Nichtnennung

⑤④ Numerical Mirror Image Strategy (NUMIS)

DE 44 32 943 A 1

EV 094 907 233 US

Derzeitiger Stand der Technik/Forschung

5 Zur Zeit gibt es mehrere Verfahren, mit denen man Peptide herstellt, die dann therapeutisch der/und biotechnologisch eingesetzt werden könnten bzw. bereits können. Dazu gehören Methoden wie z. B. die "Tea-Bag"-Methode von Houghten (1) und Mitarbeitern, das "Phage-Display"-System (2) oder die Komplementärpeptid-Strategie (3), die von Blalock und Mitarbeitern entwickelt wurde. Die Komplementärpeptid-Strategie beruht
 10 auf der Beobachtung, daß Peptide, die durch komplementäre DNA-Stränge kodiert werden, interagieren (3). Dies wird mit den zueinander gegensätzlichen hydropathischen Profilen dieser Peptide erklärt bzw. mit der inversen Hydropathie dieser Peptide erklärt (3).

Um diese Peptide in vivo zur Behandlung von Krankheiten einzusetzen, sollte man sicherstellen, daß sie in vivo über eine ausreichende Halbwertszeit verfügen. Dies könnte man durch eines von mehreren etablierten
 15 Verfahren der Peptidmodifikation erreichen, wie z. B. den Einbau einzelner D-Aminosäuren anstatt der gleichen L-Aminosäure in das zu verabreichende Peptid (4), die Herstellung des Peptids als zyklisches Peptid (5) oder die Retro-Invers-Isomerisierung des Peptids (6). Damit das Peptid intrazellulär wirksam ist, könnte man es durch Einbau eines Benzodiazepin-Fragmentes modifizieren, wie bereits gezeigt (7).

Problem

20 Die Herstellung von Peptiden für therapeutische oder biotechnologische Zwecke ist entweder technisch und finanziell relativ zu aufwendig (Houghtens "Tea-Bag-Methode", "Phage-Display"-System) oder die hergestellten Peptide haben eine relativ zu niedrige Bindungsaffinität (Komplementärpeptide), um in vivo therapeutisch eingesetzt zu werden (mögliche Ausnahme für letzteren Fall: Impfung mit Komplementärpeptiden).

Lösung/Erreichte Vorteile/Weitere Ausgestaltung der Erfindung

30 Im Folgenden stelle ich meine neue Methode vor, mit deren Hilfe relativ unaufwendig hochspezifische Peptide mit hoher Bindungsaffinität gebaut werden können, die ein großes Potential als in vivo-Therapeutika und in der Biotechnologie haben könnten.

Meine Methode heißt "Numerical Mirror Image Strategy" (kurz NUMIS) und ist eine grundlegende Weiterentwicklung der Komplementärpeptid-Strategie von Blalock und Mitarbeitern.

35 Die Blalock'sche Komplementär-Peptid-Strategie geht dabei immer von den genetischen Codons und den entsprechenden Anticodons aus (3). Da jedoch der genetische Code erlaubt, daß großenteils mehrere verschiedene Codons für die gleiche Aminosäure kodieren, (man bezeichnet daher den genetischen Code als "degeneriert") und damit die entsprechenden Anticodons für jeweils eine andere Aminosäure kodieren, kann es durchaus vorkommen, daß nicht immer das Verhältnis einer inversen Hydropathie zwischen den jeweils sich gegenüberstehenden Aminosäuren des Zielpeptids und des Komplementärpeptids vorliegt.

40 Höchstwahrscheinlich führt eine mangelnde inverse Hydropathie an einigen Stellen des Zielpeptid-Komplementärpeptid-Komplexes zu einer Einbuße in der Bindungsaffinität des Komplementärpeptids zu seinem Zielpeptid.

Die Affinität läßt sich mit dem Korrelationskoeffizienten für die Interaktion von Komplementärpeptid und Zielpeptid in einen Zusammenhang bringen, wonach nur Korrelationskoeffizienten zwischen $-0,6$ und -1 eine biologisch signifikante Interaktion widerspiegeln (8).

45 Bei der Variante der Blalock'schen Komplementärpeptid-Strategie, die von Fassina und Kollegen entwickelt wurde, werden computerrechnerisch die Aminosäuren, die mit der jeweils betrachteten Aminosäure im zu bauenden Komplementärpeptid benachbart sind, in Form eines hydropathischen Durchschnitts berücksichtigt (9). Die experimentell ermittelte, 47fach höhere Bindungsaffinität des betreffenden Fassina-Komplementärpeptids zu dem c-raf-Zielpeptid gegenüber der des Blalock-Komplementärpeptids zu dem c-raf-Zielpeptid (9) korreliert dabei interessanterweise mit dem rechnerisch höheren Korrelationskoeffizienten für den Fassina-Zielpeptid-Komplementärpeptid-Komplex gegenüber dem Blalock-Zielpeptid-Komplementärpeptid-Komplex.

50 Beide Varianten, d. h. von Blalock und von Fassina, betonen die herausragende Bedeutung der inversen Hydropathie für die Bindungsaffinität, ohne daß jedoch ein Maximum an inverser Hydropathie an jeder Stelle des Zielpeptid-Komplementärpeptid-Komplexes vorliegt.

55 Die Maximierung der Bindungsaffinität von Peptiden auf der Grundlage der inversen Hydropathie ist nun das Ziel der von mir entwickelten NUMIS-Methode. Der Ausgangspunkt der NUMIS-Methode ist zum einen die etablierte Vorstellung, daß im dreidimensionalen Raum komplementäre Protein- oder Peptidformen hochaffin einander binden und zum anderen das Postulat der Komplementärpeptid-Strategie, wonach Peptide mit zueinander inversen hydropathischen Profilen im dreidimensionalen Raum zueinander komplementäre Formen einnehmen.

Das Neue an der NUMIS-Methode ist nun, daß ein artifizieller Code geschaffen wird, der die inverse Hydropathie eines Aminosäuren-Paars zum Hauptprinzip erklärt, wobei die Ziffern der hydropathischen Scores der einander zugeordneten Aminosäuren möglichst gleich sind und nur das Vorzeichen gegensätzlich ist.

60 Die NUMIS-Methode unterscheidet sich damit von der Blalock-Methode dadurch, daß die erstere den genetischen Code nicht berücksichtigt, und von der Fassina-Methode dadurch, daß die erstere die einer beliebigen Aminosäure benachbarten Aminosäuren nicht berücksichtigt.

Die Vorhersage ist dabei, daß numerisch gleiche, aber vom Vorzeichen gegensätzliche hydropathische Scores

von einander zugeordneten Aminosäuren ein Maximum an räumlicher Komplementarität bzw. Spiegelbildlichkeit und damit ein für das jeweilige NUMIS-Peptid maximale Spezifität und Bindungsaffinität zu seinem Zielpeptid bedingen. Das Prinzip, wonach sterische Komplementarität ein Optimum an Bindungsaffinität und Spezifität bedingt, ist in der Vergangenheit ausgiebig nachgewiesen worden, neuerdings z. B. anhand des Digoxin-Digoxinantikörper-Komplexes (10).

Die NUMIS-Methode gilt für all hydrophilen und hydrophoben Aminosäuren in der Nomenklatur von Blalock und Smith (11). Die schwach hydrophilen Aminosäuren werden durch die NUMIS-Methode ebenfalls erfaßt. Ihre Zuordnung jedoch macht insofern eine Ausnahme von der Zuordnung hydrophiler und hydrophober Aminosäuren, da den schwach hydrophilen Aminosäuren gemäß dem NUMIS-Verfahren Numis-Peptid-Aminosäuren mit zwar numerisch gleichen hydropathischen Scores, aber gleichen (nämlich negativen) Vorzeichen zugeordnet werden (s. weiter unten). Dies liegt daran, daß es keine hydropathisch inverse Aminosäuren zu schwach hydrophilen Aminosäuren natürlicherweise gibt, d. h. es gibt keine schwach hydrophobe Aminosäuren.

Der Code für die Zuordnung von NUMIS-Peptid-Aminosäuren zu den jeweiligen Zielpeptid-Aminosäuren ist eindeutig und im Folgenden dargestellt (hydr. Score = hydropathischer Score).

ZIELPEPTID-AMINOSÄURE

a) hydrophile Aminosäure

<u>Name</u>	<u>hydr. Score</u>
Arginin	-4,5
Lysin	-3,9
Asparagin	-3,5
Asparaginsäure	-3,5
Glutamin	-3,5
Glutaminsäure	-3,5
Histidin	-3,2

b) hydrophobe Aminosäure

<u>Name</u>	<u>hydr. Score</u>
Isoleuzin	+4,5
Valin	+4,2
Leuzin	+3,7
Phenylalanin	+2,7
Cystein	+2,5
Methionin	+1,9
Alanin	+1,8

NUMIS-PEPTID-AMINOSÄURE

a) hydrophobe Aminosäure

<u>Name</u>	<u>hydr. Score</u>
Isoleuzin	+4,5
Leuzin	+3,7
Leuzin	+3,7
Leuzin	+3,7
Leuzin	+3,7
Leuzin	+3,7
Leuzin	+3,7

b) hydrophile bzw. schwach hydrophile Aminosäure

<u>Name</u>	<u>hydr. Score</u>
Arginin	-4,5
Arginin	-4,5
Lysin	-3,9
Histidin	-3,2
Histidin	-3,2
Prolin	-1,6
Prolin	-1,6

c) schwach hydrophile Amin säure

c) schwach hydrophile Aminosäure

	<u>Name</u>	<u>hydr. Score</u>		<u>Name</u>	<u>hydr. Score</u>
5	Glyzin	-0,4		Glyzin	-0,4
	Threonin	-0,7		Threonin	-0,7
10	Serin	-0,9		Serin	-0,9
	Tryptophan	-0,9		Tryptophan	-0,9
	Tyrosin	-1,3		Tyrosin	-1,3
15	Prolin	-1,6		Prolin	-1,6

Wenn man den hier beschriebenen NUMIS-Code dazu benutzt, ein NUMIS-Peptid zu bauen, das potentiell an das weiter oben erwähnte c-raf-Zielpeptid mit hoher Affinität bindet, dann ergibt sich folgendes NUMIS-Peptid (im "amino-acid one-lettercode" wiedergegeben):

Fig. 1 COOH-GSGSHGTRYLGLWLGLRPRL-NH₂.

Als Nächstes seien zur besseren Übersicht das c-raf-Zielpeptid und antiparallel dazu die Komplementärpeptide (CP) nach den Verfahren von Blalock bzw. Fassina sowie das NUMIS-Peptid (NP) laut meiner hier dargestellten Methode gegenübergestellt.

Fig. 2

a)	NH ₂ - GSGSFGTVYKGKWHGDVAVK -COOH	c-raf-Zielpeptid
b)	COOH- ARAGKASHVLA L PMS I NSYL -NH ₂	Blalock-CP
c)	COOH- AAAAKS SYVFA F PMS I HGHF -NH ₂	Fassina-CP
d)	COOH- GSGSHGTRYLG LWLG L RPRL -NH ₂	NP

Die Berechnung der Korrelationskoeffizienten für die Komplexe zwischen dem c-raf-Zielpeptid und jeweils dem Blalock-CP, dem Fassina-CP sowie dem NP ergibt den höchsten Wert ($r = -0,96$) für die Interaktion des c-raf-Zielpeptids mit dem NP, den zweithöchsten ($r = -0,81$) für die zwischen c-raf-Zielpeptid und Fassina-CP sowie den dritthöchsten ($r = -0,75$) für die zwischen c-raf-Zielpeptid und Blalock-CP. Aufgrund der weiter oben gemachten Ausführungen hinsichtlich der Korrelation zwischen Korrelationskoeffizienten und Bindungsaffinität, ist damit zu erwarten, daß das obige NP eine höhere Bindungsaffinität zum c-raf-Peptid als das Fassina-CP und somit auch als das Blalock-CP hat.

An diesem konkreten Beispiel wird deutlich, daß die Vorhersage hinsichtlich der Bindungsaffinität von NPs mathematisch untermauert werden kann. Bei den gegebenen Korrelationskoeffizienten und der um den Faktor 47 besseren Bindung des Fassina-CP an das c-raf-Zielpeptid im Vergleich zu der Bindung des Blalock-CP an das c-raf-Zielpeptid, kann eine um den Faktor 118 bessere Bindung des NPs an das c-raf-Zielpeptid im Vergleich zu der Bindung des Fassina-CP an das c-raf-Zielpeptid erwartet werden. Da der Komplex c-raf-Zielpeptid/Fassina-CP eine Dissoziationskonstante (K_d) besitzt, die im mikromolaren Bereich (10^{-6}) liegt (9), kann man für den Komplex c-raf-Zielpeptid / NP eine K_d im Bereich von 10^{-8} M erwarten. Damit hätte das NP eine hohe Affinität zum c-raf-Zielpeptid.

Insgesamt gesehen, ist zu erwarten, daß auch andere NPs in bezug auf entsprechende Zielmoleküle K_d -Werte im Bereich von 10^{-8} M aufweisen und sich damit sehr gut therapeutisch in vivo einsetzen ließen, und zwar entweder als Agonisten oder Inhibitoren biologischer Makromoleküle. Da verhältnismäßig weniger affin, würden Blalock-CPs oder Fassina-CPs nicht gleichermaßen wirksam sein. Die NPs würden zunächst auf übliche Weise (12) synthetisiert und getestet werden. Für die in vivo-Situation sollte man zur Verlängerung der biologischen Halbwertszeit die weiter oben angegebenen Verfahren anwenden und dann die Auswahl des optimalen in vivo-Peptids unter den verschiedenen in vivo-Varianten, d. h. dem eine oder mehrere D-Aminosäuren tragenden Peptid, dem zyklischen Peptid, dem Retro-Inverso-Isomer-Peptid mit jeweils, falls angemessen, gleichzeitiger Peptid-Modifikation zum Zweck intrazellulärer Wirkung (s. weiter oben), entsprechend dem Ausgang der experimentellen Testung treffen.

Beschreibung von zwölf Ausführungsbeispielen

1) Hintergrundinformation und potentielle Anwendungen des NPs

Insulin und die insulinähnlichen Wachstumsfaktoren beeinflussen nachhaltig das Zellwachstum in vielen Geweben. Ich habe vor kurzem die Aminosäure-Sequenz LXCXE in der B-Kette des Insulins entdeckt. Die Sequenz LXCXE kommt auch in viralen Strukturen von Tumoviren vor, die mit Hilfe dieser Sequenz einen der zentralen Tumorsuppressoren in der Zelle, das im Zellkern lokalisierte Retinoblastom-Protein (RB), inaktivieren (13). Dies legt nahe, daß Insulin Wachstum anregt, indem es RB inaktiviert, was sehr gut korrelieren würde mit der experimentell nachgewiesenen nuklearen Lokalisation von Insulin und mit den ebenfalls experimentell nachgewiesenen Effekten von Insulin auf die Genexpression. Damit bietet es sich an, die LXCXE-Sequenz in Insulin (durch ein NP) zu neutralisieren, um im gegebenen Fall Tumorstilstand zu stoppen oder gar rückgängig zu machen. Man sollte auch benachbarte Strukturen mitneutralisieren, da

- a) Insulin über die LXCXE-Sequenz hinaus ein weiteres Segment (LXEXL) besitzt, das der LXEXM-Sequenz des zelltransformierenden E7-Proteins des humanen Papillomvirus Typ 16 ähnlich ist (14)
 b) die B-Kette des Insulins eine fusionspeptidähnliche Sequenz (Insulin B-Kette₇₋₁₉) besitzt, wovon wiederum ein Teil einem Fragment des Fusionspeptids im Influenzavirus-Haemagglutinin ähnlich ist (15), und damit möglicherweise ins Zytosol und letztendlich in den Zellkern eindringt, wo es seine spezifischen Wirkungen auf das Zellwachstum entfaltet, u. a. durch die potentielle Bindung an RB.

Das Anwendungsgebiet dieses NPs wäre die Therapie vieler verschiedener Tumoren, in denen eine Beteiligung von Insulin bzw. IGFs wahrscheinlich bzw. nachgewiesen ist, z. B. Insulinom, Gliom, Melanom.

Fig. 3

- a) NH₂- LCGSHLVEALYLVCGE -COOH Insulin B-Kette₆₋₂₁
 b) NH₂- LFGAIAG -COOH Fusionspeptidfragment des Influenzavirus-Haemagglutinin
 c) COOH- KHGSLKRLPKYKKHGL -NH₂ NP
- Legende:**
- Kursivdruck in a): potentielles Fusionspeptid in Insulin B-Kette (Insulin B-Kette₇₋₁₉)
 - Fettdruck in a): HPV-ähnliche Sequenz in Insulin B-Kette
 - unterstrichen in a) und b): einander ähnliche Segmente in Insulin B-Kette₁₄₋₂₀ und Influenzavirus-Haemagglutinin-Fusionspeptidfragment

2)–4): Hintergrundinformation und potentielle Anwendungen der NPs

Es gibt eine Reihe von experimentellen Hinweisen für eine Lokalisation des Insulinrezeptors im Zellkern und für eine vermehrte Expression des Insulinrezeptors beim Mammakarzinom. Möglicherweise transloziert der Insulin-Insulinrezeptor in den Zellkern, wo Insulin über die LXCXE-Sequenz als Adaptormolekül eine potentielle Interaktion zwischen Insulinrezeptor und RB beschleunigen könnte. Damit würde der von mir schon vorhergesagte trimolekulare Komplex zwischen Insulin, Insulinrezeptor und RB entstehen, der für die Regulation des Zellwachstums maßgeblich sein dürfte.

Ich habe nun in der α -Untereinheit des Insulinrezeptors (IR) eine nukleare Lokalisationssequenz (NLS), eine CCHC-Box ähnlich der retroviralen CCHC-Box und eine zinkfingerähnliche Sequenz (ZF) entdeckt (16), die man alle durch jeweilige NPs neutralisieren und damit möglicherweise die wachstumsfördernde Wirkung des Insulinrezeptors im Mammakarzinom ausschalten könnte.

2)

Fig. 4 a) NH_2 - **RR SYALVSLSFF RKLRL** -COOH IR-NLS

5

b) COOH- **IISYPKRSKSHHILKIK** - NH_2 NP

3)

10

Fig. 5 a) NH_2 - **CVETCPPPPYYHFQDWRC** -COOH IR-CCHC

b) COOH- **HRLTHPPPPYYLHLLWIH** - NH_2 NP

15

4)

Fig. 6 a) NH_2 - **CIPECPSGYTMNSSNLLCTPC** -COOH IR-ZF

20

b) COOH- **HRPLHPSGYTPLSSLKKHTPH** - NH_2 NP

5)–10): Hintergrundinformation und potentielle Anwendungen der NPs

25

Ich habe in den konstanten Domänen der Immunglobuline Sequenzabschnitte entdeckt, die nahelegen, daß diese Abschnitte Metallionen, speziell Zinkionen, und, über die dadurch herbeigeführte Entstehung einer Zinkfingerstruktur, auch Nukleinsäuren binden könnten (17). Daraus folgt, daß diese Abschnitte möglicherweise die Genexpression in normalen und neoplastischen lymphatischen Zellen beeinflussen (17).

30

Da bestimmte Immunglobulinklassen und -subklassen in bestimmten lymphoiden Tumoren (z. B. im Multiplen Myelom oder auch in Heavy Chain Disease-Formen) überexprimiert werden sowie an der Pathogenese dieser Tumoren beteiligt sein dürften, könnten die von mir entdeckten Abschnitte in Immunglobulinen mit Hilfe von NPs neutralisiert werden und damit diese Erkrankungen therapeutisch angegangen werden.

35

40

45

50

55

60

65

5)

Fig. 7

a) NH_2 -
 CNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKTH
 -COOH

IgG1-
ZF

5

b) COOH-
 HLRLLPSLTLRLLPLPLSHLLTL
 -NH₂

NP

10

6)

Fig. 8

a) NH_2 -
 CNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVEC
 -COOH

IgG2-
ZF

15

20

b) COOH
 HLRLLPSLTLRLLTRLILHRLH
 -NH₂

NP

25

7)

Fig. 9

a) NH_2 - CPRCPEPKSCDTPPPCPRC -COOH

IgG3-
ZF

30

b) COOH- HPIHPLPLSHLTPPPHPIH -NH₂

NP

8)

Fig. 10

a) NH_2 -
 CNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSC
 -COOH

IgG4-
ZF

35

40

b) COOH-
 HLRLLPSLTLRLLIRLSLYGPPHPSH
 -NH₂

NP

45

50

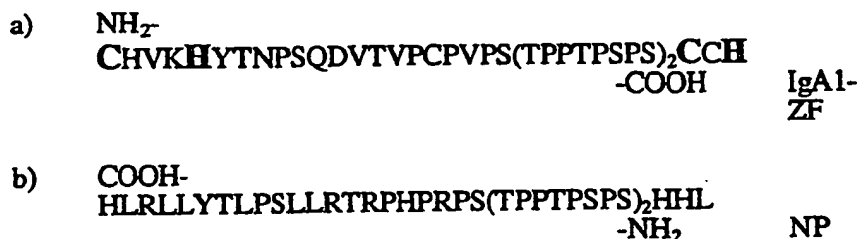
55

60

65

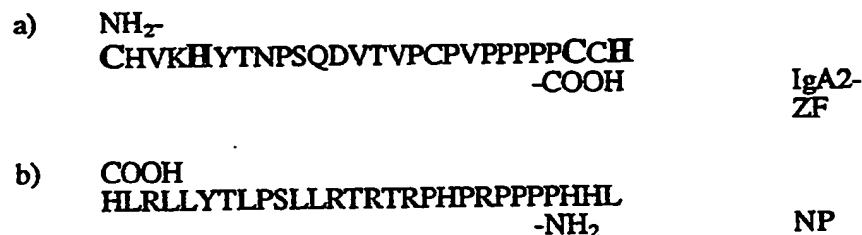
9)

Fig. 11



10)

Fig. 12

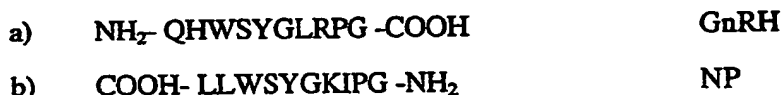


11) Hintergrundinformation und potentielle Anwendung des NPs

Zur palliativen Therapie des fortgeschrittenen Prostatakarzinoms werden derzeit GnRH-Analoga mit nur mäßigem Erfolg eingesetzt. Die Überlegung ist dabei, den GnRH-Rezeptor zu desensitivieren und herunterzuregulieren, um damit über eine Reduktion der Gonadotropinsekretion eine Abnahme der Testosteron-Produktion zu bewirken und somit den wachstumsfördernden Einfluß des Testosterons auf das Prostatakarzinom auszuschalten.

Ich schlage hier eine direkte Neutralisierung des GnRH durch ein entsprechendes NP als eine effektive Alternativ-Therapie des Prostatakarzinoms vor.

Fig. 13



12) Hintergrundinformation und potentielle Anwendung des NPs

Interleukin-5 (IL-5) ist ein Zytokin, das spezifisch die Differenzierung der eosinophilen Leukozyten induzieren (18) sowie die Proliferation leukämischer Zellen anregen kann (19). Ich habe in der Aminosäuresequenz von humanem IL-5 eine nukleäre Lokalisationssequenz (NP) entdeckt, deren Vorhandensein darauf hinweist, daß IL-5 das zelluläre Wachstum über intrazelluläre, genauer intranukleäre Mechanismen beeinflussen könnte (20). Für die Tumorzelle würde dies bedeuten, daß IL-5 sowohl als exogener Wachstumsfaktor als auch als autokriner bzw. intrakriner Wachstumsfaktor in den Zellkern gelangt und dort wirksam wird. Aufgrund dieser Überlegungen könnte es sich als eine effiziente Anti-Tumor-Therapie erweisen, die Neutralisierung der NLS im humanen IL-5 (kurz: hIL-5) durch ein entsprechendes NP zu erreichen.

Fig. 14



Literaturverzeichnis

1. Houghten, R. A. et al (1991). Generation and use of synthetic peptide combinatorial libraries for basic research and drug discovery. Nature 354, 84-86.
2. Balass, M. et al (1993). Identification of a hexapeptide that mimics a conformation-dependent binding site of acetylcholine receptor by use of a phage-epitope library. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 10 638-10 642.
3. Blalock, J. E. (1990). Complementarity of peptides specified by "sense" and "antisense" strands of DNA. Trends Biotechnol. 8, 140-144.
4. Rosenblatt, M. (1986). Peptide hormone antagonists that are effective in vivo. Lessons from parathyroid

hormone. New Engl. J. Med. 315, 1004—1013.

5. Moore, M. L. (1992). "Peptide design considerations" in Synthetic peptides/A user's guide, ed. G. A. Grant, W. H. Freeman and Company, New York.

6. Jameson, B. A. et al (1994). A rationally designed CD4 analogue inhibits experimental allergic encephalomyelitis. Nature 368, 744—746.

7. James, G. L. et al (1993). Benzodiazepine peptidomimetics: potent inhibitors of ras farnesylation in animal cells. Science 260, 1937—1942.

8. Tritsch, G. L. (1991). Proposed loci of interaction between bombesin and its receptor. J. Mol. Recognit. 4, 53—56.

9. Fassina, G. et al (1989). Recognition properties of peptides hydropathically complementary to residues 356—375 of the c-raf protein. J. Biol. Chem. 264, 11 252—11 257.

10. Jeffrey, P. D. et al (1993). 26-10 Fab-digoxin complex: affinity and specificity due to surface complementarity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 10 310—10 314.

11. Blalock, J. E. and Smith, E. M. (1984). Hydropathic anti-complementarity of amino acids based on the genetic code, Biochem. Biophys. Res. Commun. 121, 203—207.

12. Fields, G. B. et al (1992). "Principles and practice of solid-phase peptide synthesis" in Synthetic peptides/A user's guide, ed. G. A. Grant, W. H. Freeman and Company, New York.

13. Radulescu, R. T. and Wendtner, C. M. (1992). Proposed interaction between insulin and retinoblastoma protein, J. Mol. Recognit. 5, 133—137.

14. Radulescu, R. T. (1994a), unpublished observation.

15. Radulescu, R. T. (1994b), unpublished observation.

16. Radulescu, R. T. (1994c), Nuclear targeting sequence and putative zinc fingers in the α -subunit of the insulin receptor, submitted.

17. Radulescu, R. T. (1994d), Antibody constant region: potential to bind metal and nucleic acid, submitted.

18. Campbell, H. D. et al (1987). Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of the gene encoding human eosinophil differentiation factor (interleukin 5). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 6629—6633.

19. Löwenberg, B. and Touw, I. P. (1993), Hematopoietic growth factors and their receptors in acute leukemia, Blood 81, 281—292.

20. Radulescu, R. T. (1994e), unpublished observation.

Patentanspruch

Spezifisch geschützt werden sollen

1) meine von mir entwickelte Methode zur Herstellung von Peptiden mit einer hohen Bindungsaffinität zu einem entsprechenden Zielmolekül, insbesondere einem Zielprotein, und die den Namen "Numerical Mirror Image Strategy" (kurz NUMIS) trägt;

2) die potentiellen Anwendungen der in 1) erwähnten NUMIS-Methode in Diagnostik und Therapie von Krankheiten in der Medizin sowie in der Biotechnologie;

3) die auf der Basis der in 1) erwähnten NUMIS-Methode in dieser Patentanmeldung weiter unten beschriebenen Ausführungsbeispiele, und zwar zwölf verschiedene antineoplastische Peptide.

- Leerseite -